



Istruzioni per risospendere il DNA

1. Prima di aprire il tubo contenente il DNA, si prega di centrifugare brevemente la provetta; il DNA liofilizzato potrebbe essere attaccato alle pareti della provetta e andare perso senza centrifugazione.
2. Il DNA liofilizzato è stabile a -20°C per almeno 1 anno. Il DNA disciolto in TE è stabile per almeno 6 mesi a -20°C o 4°C . Il DNA disciolto in acqua è stabile per almeno 6 mesi a -20°C in assenza di nucleasi. Assicurarsi che l'acqua utilizzata sia a pH neutro per evitare depurinazione. Il DNA disciolto in acqua non è stabile a 4°C .
3. Protocollo consigliati per ri-trasformare il plasmide:
 - A) Risospendere il plasmide (4ug) in $40\ \mu\text{l}$ di 10mM Tris (pH 8,5). La concentrazione finale è $\sim 100\ \text{ng} / \text{ul}$. Per determinare con precisione la quantità di DNA presente, si prega di misura la densità ottica a 260nm con uno spettrofotometro.
 - B) In una nuova provetta, effettuare una diluizione 1:10 dello stock originale in 10mM Tris (pH 8,5).
 - C) Trasformare $2\ \mu\text{l}$ di DNA non diluito e $2\ \mu\text{l}$ di DNA diluito 1:10 con un'aliquota di cellule competenti di *E. coli* (Dh5 α , JM109; si sconsiglia l'uso di cellule BL21); piastrare le cellule su LB agar (contenente l'antibiotico desiderato) ed incubarle a 37°C over/night
 - D) Selezionare una colonia singola e ben separata ed inoculare in terreno LB liquido con l'antibiotico specifico

N.B.: è importante selezionare una colonia singola.

E) Purificare il DNA con kit commerciali.